



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	甲第1753号
学位記番号	第1250号
氏名	遠藤 浩二郎
授与年月日	令和2年3月25日
学位論文の題名	Ghrelin signaling attenuates the inflammatory activation of neuroimmune system in senescence (グレリンのシグナル伝達は老化による神経免疫系の炎症反応を抑制する) Journal of Brain Science (in press)
論文審査担当者	主査： 松川 則之 副査： 山崎 小百合，飛田 秀樹

論 文 内 容 の 要 旨

【はじめに】：ミクログリアは中枢神経系の主要な免疫細胞であり、老化した脳において炎症を誘発しニューロンおよびその前駆細胞の変性を促進することで、認知症および運動障害を起こします。老化による中枢神経内の免疫が活性化する原因は未だに解明されておらず、炎症反応による神経変性を改善する治療方法も確立されてはいません。アルツハイマー病やフレイル、ロコモティブシンドロームは、高齢者の中枢神経の炎症反応が原因となる疾患です。したがって、炎症性老化脳において、ミクログリアを含む神経免疫細胞は治療標的と考えられていますが、炎症を抑制する経路はまだ確立されていません。最近の報告で、消化管で分泌されるグレリンが老化を促進する動物モデルの脳においてミクログリアの活性化を抑制していることまでがわかりましたが、その詳しい分子メカニズムは不明のままです。又、私たちのデータでは、漢方薬である六君子湯が、グレリンを誘発していることがわかっております。本研究は、炎症性老化脳とグレリンの関連性を評価するために、ミクログリアに対するグレリンの抑制反応とそれ以下の経路を調査したものです。

【方法と結果】：形態解析 老化抑制遺伝子である klotho 遺伝子を欠損させることで老化促進マウスができます。このマウスのグレリン濃度は、コントロールに比較して有意に低値でした。これに基づいて、六君子湯を klotho 欠損マウスに投与し、グレリンの濃度およびミクログリアの活性を調べました。六君子湯を投与したマウスは、コントロールと比較して高濃度のグレリンを示しました。脳スライスの分析では、klotho 欠損マウスの海馬では活性化したアメボイド型のミクログリアが観察されましたが、六君子湯を投与されたマウスでは通常のラミファイドでした。Sox-2 を発現する神経幹細胞の減少が、klotho 欠損マウスの海馬顆粒細胞層で観察されました。六君子湯を投与されたマウスでは、海馬の神経の回復が認められました。

神経保護及び炎症産物の産生におけるグレリンの影響 マウスから採取したミクログリアをグレリンで刺激し、逆転写および PCR を行い神経保護および炎症性因子を定量的に分析しました。グレリンが神経保護因子の産生をミクログリアに誘導する一方で、炎症性因子を減少させることが確認できました。さらに、ミクログリアの貪食活性に対するグレリンの影響も分析しました。グレリンで処理されたミクログリアで蛍光ビーズの貪食取り込みが増強されることを示し、グレリンがミクログリアの活性化を誘導したことを実証しました。

in vitro での神経幹細胞におけるグレリンの抗炎症活性の検証 klotho 欠損マウスのミクログリアを炎症誘発蛋白質である LPS で刺激した後グレリンを投与して、神経幹細胞と共培養しました。グレリンの抗炎症活性をコロニー形成能力の定量化により評価しました。結果、グレリンはミクログリアの神経保護への移行を誘導し、神経毒性を低下させ、神経の新生を回復させることが示されました。

神経炎症の調節におけるグレリン受容体下流の SIRT1 を介したシグナル伝達経路の関与 カロリー制限とそれに関連するグレリン産生は、ニューロン間の接続を維持する cAMP 応答配列結合蛋白質 (CREB) とそれに続く SIRT1 の活性を誘導します。この研究では、六君子湯を投与した 5 週齢の klotho 欠損マウスの脳を解剖し、SIRT1 の活性とタンパク質発現の定量分析を行いました。コントロールの klotho 欠損マウスと比較して、SIRT1 の活性は海馬および視床下部で有意に高くありました。

【結論】：老化した中枢神経系において、ミクログリアを代表とした神経免疫細胞が慢性的に活性化し、成人の神経発生に影響します。脳の免疫系反応による炎症の活性化は認知症を発症したりモチベーションを欠損させたりします、これはアルツハイマー病やロコモティブシンドロームの病理にも関連してきます。炎症性老化脳とミクログリアの関係性は多くの文献で報告されておりますが、神経炎症をターゲットとしている治療戦略の報告はほとんどありません。今回の発見に基づいてグレリンシグナル伝達カスケードを刺激することにより、神経炎症の抑制により脳機能障害の回復を目指すという治療戦略が提案できます。食習慣の改善と適切な運動の実施によって胃グレリン分泌の機能障害が回復したことも報告されており、胃腸環境の回復に影響するバランスの取れた食事と運動、グレリン-SIRT1 シグナル伝達カスケードの調整は、老化した脳およびそれに関連する神経、精神障害でおこるアルツハイマー病、フレイル、ロコモティブシンドロームの治療に有益である可能性があります。

(注) 和文で2, 000字以内でまとめる

論文審査の結果の要旨

【背景と目的】 ミクログリアは中枢神経系の主要な免疫細胞であり、老化した脳において炎症を誘発し、認知症および運動障害を起こします。老化による中枢神経内の免疫が活性化する原因は未だに解明されておらず、炎症反応による神経変性を改善する治療方法も確立されてはいません。本研究は、炎症性老化脳とグレリンの関連性を評価するために、ミクログリアに対するグレリンの抑制反応とそれ以下の経路を調査したものです。

【方法と結果】 **形態解析** 老化抑制遺伝子である klotho 遺伝子を欠損させることでできる老化促進マウスのグレリン濃度は低値でした。六君子湯を klotho 欠損マウスに投与し、グレリンの濃度およびミクログリアの活性を調べた所、高濃度のグレリンを示しました。脳スライス分析では、klotho 欠損マウスの海馬では活性化したアメボイド型のミクログリアが観察されましたが、六君子湯を投与されたマウスでは通常のラミファイドでした。Sox-2 を発現する神経幹細胞の減少が、klotho 欠損マウスの海馬顆粒細胞層で観察されました。六君子湯を投与されたマウスでは、海馬の神経の回復が認められました。

神経保護及び炎症産物の産生におけるグレリンの影響 マウスから採取したミクログリアをグレリンで刺激し、PCR で神経保護および炎症性因子を定量的に分析しました。グレリンが神経保護因子の産生をミクログリアに誘導する一方で、炎症性因子を減少させることが確認できました。さらに、グレリンで処理されたミクログリアで蛍光ビーズの貪食取り込みが増強されることを示し、グレリンがミクログリアの活性化を誘導したことを実証しました。

in vitro での神経幹細胞におけるグレリンの抗炎症活性の検証 klotho 欠損マウスのミクログリアを LPS で刺激した後グレリンを投与して、神経幹細胞と共培養しました。結果、グレリンはミクログリアの神経保護への移行を誘導し、神経の新生を回復させることが示されました。

神経炎症の調節におけるグレリン受容体下流の SIRT1 を介したシグナル伝達経路の関与 六君子湯を投与した 5 週齢の klotho 欠損マウスの脳を解剖し、SIRT1 の活性とタンパク質発現の定量分析を行いました。SIRT1 の活性は海馬および視床下部で有意に高くありました。

【考察】 脳の免疫系反応による炎症の活性化は認知症を発症したりモチベーションを欠損させたりします、これはアルツハイマー病やロコモティブシンドロームの病理にも関連してきます。神経炎症をターゲットとしている治療戦略の報告はほとんどなく、今回の発見に基づいてグレリンシグナル伝達カスケードを刺激することにより、神経炎症の抑制により脳機能障害の回復を目指すという治療戦略が提案できます。食習慣の改善と適切な運動の実施によって胃グレリン分泌の機能障害が回復したことも報告されており、胃腸環境の回復に影響するバランスの取れた食事と運動、グレリン-SIRT1 シグナル伝達カスケードの調整は、老化した脳およびそれに関連する神経、精神障害でおこるアルツハイマー病、フレイル、ロコモティブシンドロームの治療に有益である可能性があります。

【審査内容】 約 20 分間のプレゼンテーションの後、主査の松川教授から Klotho 遺伝子ノックアウトマウスの特性、六君子湯に含まれる化学的成分、正常加齢モデルにも同等の結果が得られるかなど 9 項目、第一副査の山崎教授から免疫染色陽性細胞定量法の妥当性、ミクログリアの採取方法、ラテックスビーズを用いた貪食能評価法など 10 項目、第二副査の飛田教授より、5 週令マウスを老齡化モデルとして使用した妥当性、ELISA 法の具体的な方法、neurosphere 法による stem cell 採取法、ミクログリア機能解析における培養法の問題点など 12 項目の質問がなされた。申請者は答えに窮する場面が幾度となく見受けられたが概ね満足のいく回答が得られ、申請者は学位論文の内容を把握し、大学院修了者としての学力を備えていると判断した。

本研究は、Klotho 遺伝子ノックアウトマウス海馬において、六君子湯がグレリン・SIRT1 シグナルを介して活性型ミクログリアを抑制する可能性を示し、科学的評価に値する。よって、本論文著者は、博士（医学）の学位を授与するのに値するものと判定した。

論文審査担当者 主査 松川 則之 副査 山崎 小百合、 飛田 秀樹